

10/535277

535,277

Rec'd PCTO 18 MAY 2005

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 6 月 24 日 (24.06.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/052908 A1(51) 国際特許分類⁷: C07H 19/073, 19/173

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/015529

(22) 国際出願日: 2003 年 12 月 4 日 (04.12.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-357209 2002 年 12 月 9 日 (09.12.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三井化学株式会社 (MITSUI CHEMICALS, INC.) [JP/JP]; 〒105-7117 東京都 港区 東新橋一丁目 5 番 2 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小松 弘典 (KOMATSU, Hironori) [JP/JP]; 〒299-0265 千葉県 袖ヶ浦

市長浦 5 8 0-3 2 三井化学株式会社内 Chiba (JP).
檜原 真弓 (HIWARA, Mayumi) [JP/JP]; 〒299-0265 千葉県 袖ヶ浦市 長浦 5 8 0-3 2 三井化学株式会社内 Chiba (JP).

(81) 指定国 (国内): CN, DE, GB, JP, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

規則 4.17 に規定する申立て:

— US のみのための発明者である旨の申立て (規則 4.17(iv))

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING PHOSPHOROAMIDITE

(54) 発明の名称: フォスフォロアミダイトの製造方法

(57) Abstract: A phosphoroamidite product of high purity provided through reduction of the amount of by-product triphosphite impurities formed in conventional processes. Phosphoroamidites are obtained at high purity by suppressing excess reactions with the use of a reaction activator capable of inhibiting the formation of triphosphites. Although it has been difficult to inhibit the formation of triphosphite impurities, the above means enables obtaining phosphoroamidites at high purity.

(57) 要約: 本発明は従来の方法で副成していたトリフォスファイト不純物の量を低減し、高純度のフォスフォロアミダイト製品を提供する。トリフォスファイトを生成しにくい反応活性化剤を使用し、過剰反応を抑えることでフォスフォロアミド類を高純度で得る。本発明により、これまでトリフォスファイト不純物の生成を抑制することが困難であったが、フォスフォロアミド類を高純度で得ることが可能になった。

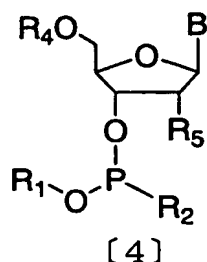
WO 2004/052908 A1

明 細 書

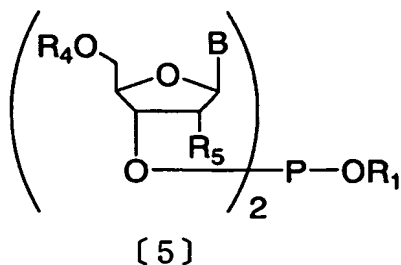
フォスフォロアミダイトの製造方法

技術分野

本発明はフォスフォロアミダイトの製造法に関する。さらに詳しくは、本発明は、一般式〔４〕



（式中、R 1は炭素数１から４のアルキル基、シアノ基で置換された炭素数１から４のアルキル基またはシリル基で置換された炭素数１から４のアルキル基を表し、R 2は炭素数２から５のアルキル基で置換されたアミノ基または炭素数４から７の脂環状アミノ基を表し、R 4は水酸基の保護基を、R 5は水素原子、ハロゲン原子、炭素数１から４のアルキル基または置換された水酸基を、Bは核酸塩基または保護された核酸塩基を表す。）で表されるフォスフォロアミダイト製造の際に、一般式〔５〕



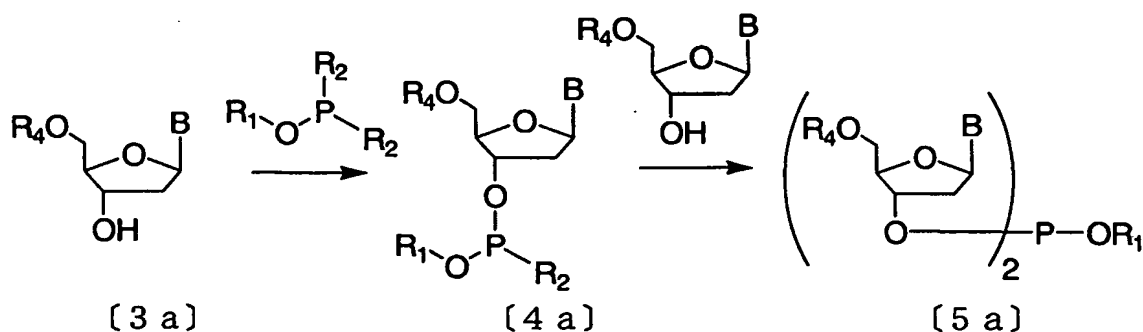
(式中、R 1、R 4およびR 5は前述と同義である。) で表されるトリフォスファイトなる副成物の生成量を減らし、フォスフォロアミダイト生成の選択性を向上するように開発された反応活性化剤に関する。

背景技術

近年、ゲノム創薬の進展に伴い、アンチセンスDNA医薬などが急速に開発されている。それに伴い、原料となるDNAオリゴマー、さらにオリゴマーの原料となるフォスフォロアミダイト類の需要が増大している。フォスフォロアミダイト類を医薬品の用途として用いるためには、非常に高純度の製品を製造する必要がある。

これまでフォスフォロアミダイト類は、たとえばNucleic Acids Res, 12, p4051 (1984) [またはNucleic Acids Res, 18, p177 (1987)] に記載の方法のように、フォスフォロジアミダイトを反応試剤、テトラゾールを反応活性化剤として用いて、ヌクレオシドの水酸基と反応させる方法で合成できる。この報文では、反応で生成する不純物について詳しく解析している。主要な不純物のうち、水分に起因する分解物については反応系内の水分量を減らすことにより低減できる。しかし、反応で用いた活性化剤の性質によって生成する副成物を低減することは難しい。式1

〔式1〕



(式中、R 1はメチル基またはシアノエチル基を、R 2はジイソプロピルアミノ基、R 4は4, 4'-ジメトキシトリチル基を、Bは1-チミン基を表す。) に示した通り、過剰反応物(一般式〔5 a〕で表されるトリフォスファイト)は、目的とする一般式〔4 a〕で表されるフォスフォロアミダイトがさらに一般式〔3 a〕で表される原料ヌクレオシドと反応することで生成する。混入比率は1% (NMR解析

結果)で少ないとの記述があるが、アンチセンス医薬などの医薬品用途ではさらに低減する必要がある。フォスフォロアミダイト類は不安定で精製は難しいため、反応の段階で副成物を極力低減することが必要とされる。US 4 4 1 5 7 3 2に記載されているように、テトラゾールは、元来オリゴマーのようなトリフォスファイトの合成を目的として開発されたため、一般式〔4 a〕で表されるフォスフォロアミダイトから一般式〔5 a〕で表されるトリフォスファイトに至る反応は非常に速い。現在でもオリゴマー合成に多用される活性化剤である。

Org. Process Res. Dev. 4, p 1 7 5 (2 0 0 0) または WO 9 9 6 2 9 2 2 に記載の方法は、テトラゾールがコスト高という欠点を改善するため、ピリジントリフルオロ酢酸塩を用いている。しかしながら、テトラゾールと同様にオリゴマー合成への有用性が記述されているように、トリフォスファイトの生成能は高い。

オリゴマー合成への利用を目的として、テトラゾールに代わる数多くの活性化剤が報告されている。しかし、オリゴマー合成を固相合成で行うためには、できるだけ短時間でトリフォスファイトを形成する必要がある点でフォスフォロアミダイトの選択的な合成とは目的が異なっていた。つまり、一般式〔4 a〕で表されるフォスフォロアミダイトを製造するには一般式〔5 a〕で表されるトリフォスファイトの副成量を低減する必要があるため、これらの方法は不向きであった。典型的な例が Tetrahedron Lett. (24) p 3 1 7 1 (1983) に記載されている。この報文で報告されている 5-(4-ニトロフェニル)テトラゾールは、テトラゾールの反応速度を大きく上回るように設計されており、非常に効率的にトリフォスファイトであるオリゴマーを生成する。また、フェニルテトラゾールもトリフォスファイト合成の活性化剤として図中に例示されているが、溶解性が悪いことから活性評価する価値がないと判断された旨記載があり、フォスフォロアミダイトを選択的に合成できるという活性化剤としての有用性を見出すには到らなかった。

このように、一般式〔5 a〕で表されるトリフォスファイトへの反応は進行しにくく、一般式〔4 a〕で表されるフォスフォロアミダイトを選択的に合成できるような活性化剤は開発されていなかった。

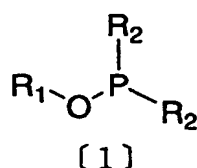
発明の開示

従来の問題点を鑑み、本発明の課題は効率的で副反応の少ないフォスフォロアミダイト製造法を提供することである。

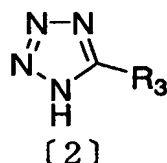
本発明者らは上記課題について鋭意検討した結果、5-フェニルテトラゾールが選択性良くフォスフォロアミダイトを生成することを見出し、本発明を完成した。

即ち、本発明は、

[1] 一般式〔1〕

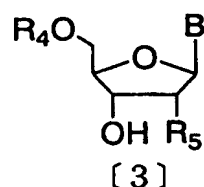


(式中、R₁は炭素数1から4のアルキル基、シアノ基で置換された炭素数1から4のアルキル基またはシリル基で置換された炭素数1から4のアルキル基を表し、R₂は炭素数2から5のアルキル基で置換されたアミノ基または炭素数4から7の脂環状アミノ基を表す。)で表される化合物を反応剤としてフォスフォロアミダイトを製造する方法であって、一般式〔2〕

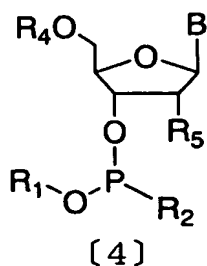


(式中、R₃は炭素数1から6の脂環状アルキル基、炭素数1から4のアルキル基で置換されたアリール基または置換されていないアリール基を表す。)で表される置換テトラゾールを反応活性化剤として用いることを特徴とする製造法であり、

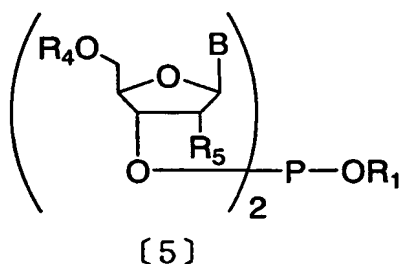
[2] 一般式〔3〕



(式中、R₄は水酸基の保護基を、R₅は水素原子、ハロゲン原子、炭素数1から4のアルキル基または置換された水酸基を、Bは核酸塩基または保護された核酸塩基を表す。)で表されるヌクレオシド誘導体を原料とし、一般式〔4〕



（式中、R 1、R 2、R 4、R 5 およびBは前述と同義である。）で表されるフォスフロアミダイトを合成する際に、一般式〔５〕



（式中、R 1、R 2、R 4 およびR 5 は前述と同義である。）で表されるトリフォスファイトの生成を抑えることを特徴とする〔１〕に記載の製造法であり、

〔３〕一般式〔２〕中、R 3 がフェニル基である〔１〕又は〔２〕に記載の製造法であり、

〔４〕一般式〔１〕中、R 1 がシアノエチル基であり、R 2 がジイソプロピルアミノ基である〔１〕から〔３〕の何れか一項に記載の製造法であり、

〔５〕一般式〔３〕および〔４〕中、R 4 が４，４′-ジメトキシトリチル基であり、R 5 が水素原子であり、Bが１-チミン基、N 4-ベンゾイル-１-シトシン基、N 6-ベンゾイル-９-アデニン基またはN 2-イソブチリル-９-グアニン基である〔２〕から〔４〕の何れか一項に記載の製造法である。

本発明により、大量製造可能な方法を用いて、従来の方法に比べ効率的に高純度のフォスフロアミダイト類を製造することができるようになった。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

一般式〔1〕で表されるフォスフォロジアミダイト等において、R₁における炭素数1から4のアルキル基とは、たとえばメチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、イソブチル基、*tert*-ブチル基などがあげられる。シアノ基で置換された炭素数1から4のアルキル基とは、たとえば2-シアノエチル基、2-シアノプロピル基、2-シアノシクロプロピル基、2-シアノブチル基、2-シアノ-2-メチルプロピル基などがあげられるがこれらに限定されるものではない。R₁におけるシリル基で置換された炭素数1から4のアルキル基とは、たとえば2-トリメチルシリルエチル基、2-トリメチルシリルプロピル基、2-トリメチルシリルブチル基、2-トリメチルシリル-2-メチルプロピル基、2-トリエチルシリルエチル基、2-トリエチルシリルプロピル基、2-トリエチルシリルブチル基、2-トリエチルシリル-2-メチルプロピル基、2-トリイソプロピルシリルブチル基、2-トリイソプロピルシリル-2-メチルプロピル基、2-トリイソプロピルシリルエチル基、2-トリイソプロピルシリルプロピル基、2-トリイソプロピルシリルブチル基、2-トリイソプロピルシリル-2-メチルプロピル基、2-イソプロピルブチル基、2-トリイソプロピルシリル-2-メチルプロピル基、2-(*tert*-ブチルジメチルシリル)エチル基、2-(*tert*-ブチルジメチルシリル)プロピル基、2-(*tert*-ブチルジメチルシリル)ブチル基、2-(*tert*-ブチルジメチルシリル)-2-メチルプロピル基などがあげられるがこれらに限定されるものではない。R₂における炭素数2から5のアルキル基で置換されたアミノ基とは、たとえばジエチルアミノ基、エチル(イソプロピル)アミノ基、ジ(*n*-プロピル)アミノ基、ジイソプロピルアミノ基、ジシクロプロピルアミノ基、ジ(*n*-ブチル)アミノ基、ジ(*sec*-ブチル)アミノ基、ジ(イソブチル)アミノ基、ジ(*tert*-ブチル)アミノ基、ジ(*n*-ペンチル)アミノ基、ジ(イソペンチル)アミノ基、ジ(ネオペンチル)アミノ基、ジシクロペンチルアミノ基などがあげられるがこれらに限定されるものではない。R₂における炭素数4から7の脂環状アミノ基とは、たとえばピロリジノ基、2-メチルピロリジノ基、2,4-ジメチルピロリジノ基、ピペリジノ基、ヘプタメチレンイミノ基などがあげられるがこれらに限定されるものではない。

一般式〔2〕で表される置換テトラゾール等において、R³における炭素数1から6の脂環状アルキル基とは、たとえばシクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基などがあげられる。R³における炭素数1から4のアルキル基で置換されたアリール基とは、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、イソブチル基又は*tert*-ブチル基で置換されたアリール基を表し、たとえば2-メチルフェニル基、2-エチルフェニル基、2-イソプロピルフェニル基、2-(2-ブチル)フェニル基、2-(*tert*-ブチル)フェニル基、3-メチルフェニル基、3-エチルフェニル基、3-イソプロピルフェニル基、3-(2-ブチル)フェニル基、3-(*tert*-ブチル)フェニル基、4-メチルフェニル基、4-エチルフェニル基、4-イソプロピルフェニル基、4-(2-ブチル)フェニル基、4-(*tert*-ブチル)フェニル基、2,6-ジメチルフェニル基、2,6-ジエチルフェニル基、2,6-ジイソプロピルフェニル基、2,6-ビス(2-ブチル)フェニル基、2,6-ビス(*tert*-ブチル)フェニル基、3-メチル-2-フルフリル基、3-エチル-2-フルフリル基、3-イソプロピル-2-フルフリル基、3-(2-ブチル)-2-フルフリル基、3-(*tert*-ブチル)-2-フルフリル基、4-メチル-2-フルフリル基、4-エチル-2-フルフリル基、4-イソプロピル-2-フルフリル基、4-(2-ブチル)-2-フルフリル基、4-(*tert*-ブチル)-2-フルフリル基、3,5-ジメチル-2-フルフリル基などがあげられるがこれらに限定されるものではない。R³における置換されていないアリール基とは、たとえばフェニル基、2-フルフリル基、3-フルフリル基、2-チオフェニル基、3-チオフェニル基などがあげられるがこれらに限定されるものではない。一般式〔2〕で表される置換テトラゾールとしては、特に5-フェニル-1H-テトラゾールが好ましい。これら置換テトラゾールは、塩基との塩として反応に加えることもできるし、そのまま加えても良い。塩を形成する塩基としては、有機塩基が好ましく、たとえばトリエチルアミン、エチルジイソプロピルアミン、トリ(*n*-ブチル)アミン、1-メチルピペリジン、1-メチルピロリジンなどの3級アミン類あるいはジエチルアミン、ジイソプロピルアミン、ジ(*n*-ブチル)アミン、ピロリジン、ピペリジンなどの2級アミンがあげられるがこれらに限定されるものではない。

一般式〔3〕で表されるヌクレオシド誘導体において、R 4における水酸基の保護基とは、メチル基、エチル基、イソプロピル基、n-ブチル基、i-ブチル基、t-ブチル基、ペンチル基、ベンジル基、2-メトキシベンジル基、3-メトキシベンジル基、4-メトキシベンジル基、2-メチルベンジル基、3-メチルベンジル基、4-メチルベンジル基、メトキシエチル基、エトキシエチル基、ベンジルオキシメチル基、ベンジルオキシエチル基、アセトキシメチル基、アセトキシエチル基、ベンゾイルオキシメチル基、ベンゾイルオキシエチル基、メトキシエトキシエチル基、プロパルギル基、アリル基等のアルキル基またはアルキル基の先にさらに置換されたアルキル基、フェニル基、2-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-メトキシフェニル基、4-フェニルフェニル基、2-ピリジニル基、3-ピリジニル基、4-ピリジニル基等のアリール基、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ベンゾイル基、2-メトキシベンゾイル基、3-メトキシベンゾイル基、4-メトキシベンゾイル基、2-メチルベンゾイル基、3-メチルベンゾイル基、4-メチルベンゾイル基、2-ニトロベンゾイル基、3-ニトロベンゾイル基、4-ニトロベンゾイル基、4-フェニルベンゾイル基、2-クロロベンゾイル基、3-クロロベンゾイル基、4-クロロベンゾイル基などのアシル基、アミノカルボニル基、ジメチルアミノカルボニル基、メチルアミノカルボニル基、エチルアミノカルボニル基、ジエチルアミノカルボニル基、フェニルアミノカルボニル基などのウレタン基、メタンスルホニル基、エタンスルホニル基、ベンゼンスルホニル基、2-メチルベンゼンスルホニル基、3-メチルベンゼンスルホニル基、4-メチルベンゼンスルホニル基、トリフルオロメタンスルホニル基、トリクロロメタンスルホニル基等のスルホン酸エステル基、トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、t-ブチルジメチルシリル基、t-ブチルジフェニルシリル基などのシリル基、トリチル基、4-メトキシトリチル基、4, 4'-ジメトキシトリチル基などのトリチル基があげられる。

R 5におけるハロゲン原子とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子を表す。R 5における炭素数1から4のアルキル基とは、たとえばメチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基などがあげられる。

R 5における置換された水酸基とは、カルボン酸エステル、スルホン酸エステル、エーテル、ウレタン、シリル基などの一般的な水酸基の保護基となりうる置換基により置換された水酸基を表す。水酸基の保護基の例としては、たとえばメチル基、エチル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*i*-ブチル基、*t*-ブチル基、ペンチル基、ベンジル基、2-メトキシベンジル基、3-メトキシベンジル基、4-メトキシベンジル基、2-メチルベンジル基、3-メチルベンジル基、4-メチルベンジル基、メトキシエチル基、エトキシエチル基、ベンジルオキシメチル基、ベンジルオキシエチル基、アセトキシメチル基、アセトキシエチル基、ベンゾイルオキシメチル基、ベンゾイルオキシエチル基、メトキシエトキシエチル基、プロパルギル基、アリル基等のアルキル基またはアルキル基の先にさらに置換されたアルキル基、フェニル基、2-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-メトキシフェニル基、4-フェニルフェニル基、2-ピリジニル基、3-ピリジニル基、4-ピリジニル基等のアリール基、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ベンゾイル基、2-メトキシベンゾイル基、3-メトキシベンゾイル基、4-メトキシベンゾイル基、2-メチルベンゾイル基、3-メチルベンゾイル基、4-メチルベンゾイル基、2-ニトロベンゾイル基、3-ニトロベンゾイル基、4-ニトロベンゾイル基、4-フェニルベンゾイル基、2-クロロベンゾイル基、3-クロロベンゾイル基、4-クロロベンゾイル基などのアシル基、アミノカルボニル基、ジメチルアミノカルボニル基、メチルアミノカルボニル基、エチルアミノカルボニル基、ジエチルアミノカルボニル基、フェニルアミノカルボニル基などのウレタン基、メタンスルホニル基、エタンスルホニル基、ベンゼンスルホニル基、2-メチルベンゼンスルホニル基、3-メチルベンゼンスルホニル基、4-メチルベンゼンスルホニル基、トリフルオロメタンスルホニル基、トリクロロメタンスルホニル基等のスルホン酸エステル基、トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、*t*-ブチルジメチルシリル基、*t*-ブチルジフェニルシリル基などのシリル基が挙げられる。

R 5の置換された水酸基の例としてはたとえば、メトキシ基、エトキシ基、イソプロピルオキシ基、*n*-ブチルオキシ基、*i*-ブチルオキシ基、*t*-ブチルオキシ基、ペンチルオキシ基、ベンジルオキシ基、2-メトキシベンジルオキシ基、3-メトキシベンジルオキシ基、4-メトキシベンジルオキシ基、2-メチルベンジルオキシ基、3-メチルベンジルオキシ基、4-メチルベンジルオキシ基、メトキシ

エチルオキシ基、エトキシエチルオキシ基、ベンジルオキシメトキシ基、ベンジルオキシエトキシ基、アセトキシメトキシ基、アセトキシエトキシ基、ベンゾイルオキシメトキシ基、ベンゾイルオキシエトキシ基、メトキシエトキシエトキシ基、プロパルギルオキシ基、アリルオキシ基、フェニルオキシ基、2-メトキシフェニルオキシ基、3-メトキシフェニルオキシ基、4-メトキシフェニルオキシ基、4-フェニルフェニルオキシ基、2-ピリジニルオキシ基、3-ピリジニルオキシ基、4-ピリジニルオキシ基、ホルミルオキシ基、アセチルオキシ基、プロピオニルオキシ基、ベンゾイルオキシ基、2-メトキシベンゾイルオキシ基、3-メトキシベンゾイルオキシ基、4-メトキシベンゾイルオキシ基、2-メチルベンゾイルオキシ基、3-メチルベンゾイルオキシ基、4-メチルベンゾイルオキシ基、2-ニトロベンゾイルオキシ基、3-ニトロベンゾイルオキシ基、4-ニトロベンゾイルオキシ基、4-フェニルベンゾイルオキシ基、2-クロロベンゾイルオキシ基、3-クロロベンゾイルオキシ基、4-クロロベンゾイルオキシ基、アミノカルボニルオキシ基、ジメチルアミノカルボニルオキシ基、メチルアミノカルボニルオキシ基、エチルアミノカルボニルオキシ基、ジエチルアミノカルボニルオキシ基、フェニルアミノカルボニルオキシ基、メタンスルホニルオキシ基、エタンスルホニルオキシ基、ベンゼンスルホニルオキシ基、2-メチルベンゼンスルホニルオキシ基、3-メチルベンゼンスルホニルオキシ基、4-メチルベンゼンスルホニルオキシ基、トリフルオロメタンスルホニルオキシ基、トリクロロメタンスルホニルオキシ基、トリメチルシリルオキシ基、トリエチルシリルオキシ基、t-ブチルジメチルシリルオキシ基、t-ブチルジフェニルシリルオキシ基などが挙げられる。

Bにおける核酸塩基とは、天然型あるいは非天然型いずれの核酸塩基でも良く、たとえば1-チミン基、1-シトシン基、9-アデニン基、9-グアニン基、1-ウラシル基、5-フルオロー-1-ウラシル基、5-トリフルオロー-1-チミン基、5-メチル-1-シトシン基、6-クロロ-9-プリン基、2, 6-ジアミノ-9-プリン基、7-アデニン基、7-グアニン基、8-ブロモ-9-アデニン基、8-ブロモ-9-グアニン基、2-アミノ-9-プリン基、8-アザ-9-アデニン基、8-アザ-9-グアニン基、8-デアザ-9-アデニン基、8-デアザ-9-グアニン基などがあげられるがこれらに限定されるものではない。

Bにおける保護された核酸塩基とは、天然型あるいは非天然型いずれの核酸塩基が保護されていても良く、保護基としては通常用いられるものであれば特に限定されない。保護基としては、たとえばアセチル基、イソブチリル基、ベンゾイル基、ジメチルアミノメチリデン基、ジブチルアミノメチリデン基、パルミトイル基、ベンジルオキシアセチル基などがあげられる。保護された核酸塩基としては、たとえばN4-ベンゾイル-1-シトシン基、N4-アセチル-1-シトシン基、N6-ベンゾイル-9-アデニン基、N2-イソブチリル-9-グアニン基などがあげられる。

本発明の方法における反応溶媒としては、反応に影響を与えない限り特に限定されるものではないが、アルコール類以外の非プロトン性溶媒が好ましい。たとえばアセトニトリル、ジクロロメタン、クロロホルム、THF、ジメトキシエタン、酢酸エチル、酢酸ブチル、ヘキサン、シクロヘキサン、トルエンなどがあげられる。また、これら溶媒の混合溶媒も使用できる。

本発明の方法における反応温度としては、-30℃から使用する溶媒の沸点までで行うことができる。特に好ましくは-10℃から40℃の間である。

反応剤の使用量としては、後処理に影響を与えない限り特に限定されないが、経済性を考えると、原料のモル量に対して0.8から1.5当量が好ましい。

反応活性化剤の使用量としては、原料のモル量に対して0.01から2当量が好ましく、0.1から1.5当量が特に好ましい。

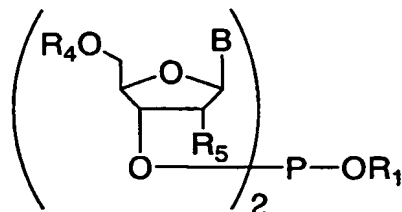
以下に実施例をあげて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

[実施例1]

5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)チミジン 3'-O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピルフォスフロアミダイト)の合成

5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)チミジン(4-メチル-2-ペンタノン)を0.5当量含有する) 2.0 g、脱水アセトニトリル10 mLを混合し、室温で攪拌した懸濁液に、2-シアノエチル N,N,N',N'-テトライソプロピルフォスフロジアミダイト1.22 g(原料のモル数に対して1.2当量)を滴下しさらに攪拌する。次いで5-フェニル-1H-テトラゾール0.05 g(原料のモル数に対して0.1当量)を添加し、室温で8時間攪拌した。

本反応液を高速液体クロマトグラフ法（逆相カラム、溶離液：水／アセトニトリル 5／5（TEAA 250mM）、検出波長：254nm）にて分析した結果、収率 97%であった。表題化合物と一般式〔5b〕で表される副成物



〔5b〕

（式中、R1は2-シアノエチル基を、R4は4, 4'-ジメトキシトリチル基を、R5は水素原子を、Bは1-チミンを表す。）の比で表される反応選択性（表題化合物のHPLC面積%／副成物のHPLC面積%）は、451であった。

〔比較例1および2〕

5'-O-（4, 4'-ジメトキシトリチル）-2'-デオキシチミジン 3'-O-（2-シアノエチル N, N-ジイソプロピルフォスフォロアミダイト）の合成

実施例1と同様の手法で、5-フェニル-1H-テトラゾールの代わりに各々、テトラゾール 0.024g（原料のモル数に対して0.1当量：比較例1）、ピリジン-トリフルオロ酢酸塩 0.068g（原料のモル数に対して0.1当量：比較例2）を用いて反応を行った。8又は24時間後の反応液を高速液体クロマトグラフ法（逆相カラム、溶離液：水／アセトニトリル 5／5（TEAA 250mM）、検出波長：254nm）にて分析した結果を〔表1〕に示す。

〔表1〕

	実施例1	比較例1	比較例2
反応選択性（8時間後）	451	265	281
収率（%, 8時間後）	94	94	64
反応選択性（24時間後）	—	—	192
収率（%, 24時間後）	—	—	82

上記表1において、反応選択性＝（表題化合物のHPLC面積%）／（副成物〔5b〕のHPLC面積%）。但し、副成物〔5b〕の式中、R1は2-シアノ

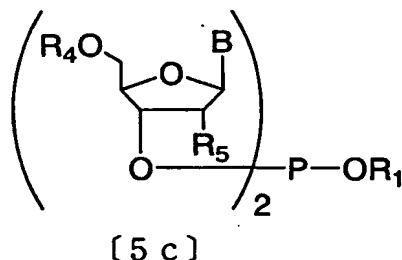
エチル基を、R 4は4, 4'-ジメトキシトリチル基を、R 5は水素原子を、Bは1-チミンを表す。

[実施例 2]

5'-O-(4, 4'-ジメトキシトリチル)-N 6-ベンゾイル-2'-デオキシアデノシン 3'-O-(2-シアノエチル N, N-ジイソプロピルフォスフォロアミダイト) の合成

5'-O-(4, 4'-ジメトキシトリチル)-N 6-ベンゾイル-2'-デオキシアデノシン 2. 0 g、脱水アセトニトリル 1 0 mL を混合し、室温で攪拌した懸濁液に、2-シアノエチル N, N, N', N'-テトライソプロピルフォスフロジアミダイト 1. 1 0 g (原料のモル数に対して 1. 2 当量) を滴下しさらに攪拌する。次いで 5-フェニル-1 H-テトラゾール 0. 5 3 g (原料のモル数に対して 1. 2 当量) を添加し、室温で 2 時間攪拌した。

本反応液を高速液体クロマトグラフ法 (逆相カラム、溶離液: 水/アセトニトリル 5/5 (TEAA 2 5 0 mM)、検出波長: 2 5 4 nm) にて分析した結果、収率 9 6 % であった。表題化合物と一般式 [5 c]



(式中、R 1は2-シアノエチル基を、R 4は4, 4'-ジメトキシトリチル基を、R 5は水素原子を、BはN 6-ベンゾイル-9-アデニンを表す。) で表される副成物の比で表される反応選択性 (表題化合物のHPLC面積%/副成物のHPLC面積%) は、1 5 2 であった。さらに 9 6 時間後の反応液を分析した結果、収率 9 9 %、反応選択性は 1 8 7 であった。

[実施例 3]

5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-N6-ベンゾイル-2'-デオキシアデノシン 3'-O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピルフォスフォロアミダイト)の合成

実施例2と同様の手法で、5-フェニル-1H-テトラゾールの当量を変えて反応を行った。5-フェニル-1H-テトラゾール0.04g(原料のモル数に対して0.1当量)を用いて24時間攪拌した。

本反応液を高速液体クロマトグラフ法(逆相カラム、溶離液:水/アセトニトリル5/5(TEAA250mM)、検出波長:254nm)にて分析した結果、収率99%であった。表題化合物と一般式〔5c〕で表される副成物の比で表される反応選択性(表題化合物のHPLC面積%/副成物のHPLC面積%)は、699であった。

[実施例4]

5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-N6-ベンゾイル-2'-デオキシアデノシン 3'-O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピルフォスフォロアミダイト)の合成

実施例2と同様の手法で、5-フェニル-1H-テトラゾールの当量を変えて反応を行った。5-フェニル-1H-テトラゾール0.22g(原料のモル数に対して0.5当量)を用いて8時間攪拌した。

本反応液を高速液体クロマトグラフ法(逆相カラム、溶離液:水/アセトニトリル5/5(TEAA250mM)、検出波長:254nm)にて分析した結果、99%であった。表題化合物と一般式〔5c〕で表される副成物の比で表される反応選択性(表題化合物のHPLC面積%/副成物のHPLC面積%)は、785であった。

[比較例3~5]

実施例2と同様の手法で、5-フェニル-1H-テトラゾールの代わりに各々、テトラゾール0.256g(原料のモル数に対して1.2当量:比較例3)、ピリジン-トリフルオロ酢酸塩0.707g(原料のモル数に対して1.2当量:比較例4)、5-(4-ニトロフェニル)-1H-テトラゾール0.689g(原料の

モル数に対して1.2当量：比較例5)を用いて反応を行った。96時間後の反応液を高速液体クロマトグラフ法(逆相カラム、溶離液：水／アセトニトリル5／5 (TEAA 250mM)、検出波長：254nm)にて分析した結果を[表2]に示す。

[表2]

	実施例2	比較例3	比較例4	比較例5
反応選択性	187	49	91	9
収率(%)	99	99	92	79

[比較例6～8]

実施例4と同様の手法で、5-フェニル-1H-テトラゾールの代わりに各々、テトラゾール0.107g(原料のモル数に対して0.5当量：比較例6)、ピリジン-トリフルオロ酢酸塩0.295g(原料のモル数に対して0.5当量：比較例7)、5-(4-ニトロフェニル)-1H-テトラゾール0.291g(原料のモル数に対して0.5当量：比較例8)を用いて反応を行った。96時間後の反応液を高速液体クロマトグラフ法(逆相カラム、溶離液：水／アセトニトリル5／5 (TEAA 250mM)、検出波長：254nm)にて分析した結果を[表3]に示す。

[表3]

	実施例4	比較例6	比較例7	比較例8
反応選択性	785	101	39	153
収率(%)	99	99	92	98

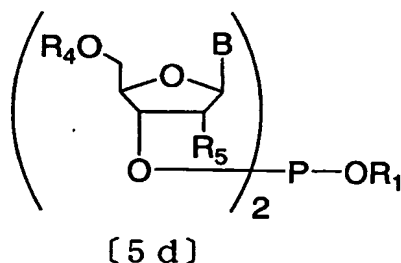
上記表3において、反応選択性＝(表題化合物のHPLC面積%)／(一般式〔5c〕で表される副成物のHPLC面積%)

[実施例5]

5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-N4-ベンゾイル-2'-デオキシシチジン 3'-O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピルフォスフォロアミダイト)の合成

5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-N4-ベンゾイル-2'-デオキシシチジン 2.0 g、脱水アセトニトリル 10 mL を混合し、室温で攪拌した懸濁液に、2-シアノエチル N, N, N', N'-テトライソプロピルフォスフォロジアミダイト 1.14 g (原料のモル数に対して 1.2 当量) を滴下しさらに攪拌する。次いで 5-フェニル-1H-テトラゾール 0.185 g (原料のモル数に対して 0.4 当量) を添加し、室温で 5 時間攪拌した。

本反応液を高速液体クロマトグラフ法 (逆相カラム、溶離液: 水/アセトニトリル 4/6 (TEAA 62.5 mM)、検出波長: 254 nm) にて分析した結果、収率 99% であった。表題化合物と副成物 [5d]



(式中、R1 は 2-シアノエチル基を、R4 は 4,4'-ジメトキシトリチル基を、R5 は水素原子を、B は N4-ベンゾイル-1-シトシンを表す。) の比で表される反応選択性 (表題化合物の HPLC 面積% / 副成物の HPLC 面積%) は、284 であった。

[比較例 9 および 10]

N4-ベンゾイル-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-デオキシシチジン 3'-O-(2-シアノエチル N, N-ジイソプロピルフォスフォロジアミダイト) の合成

実施例 5 と同様の手法で、5-フェニル-1H-テトラゾールの代わりに各々、テトラゾール 0.088 g (原料のモル数に対して 0.4 当量: 比較例 9)、ピリジントリフルオロ酢酸塩 0.244 g (原料のモル数に対して 0.4 当量: 比較例 10) を用いて反応を行った。5 時間後の反応液を高速液体クロマトグラフ法 (逆相カラム、溶離液: 水/アセトニトリル 4/6 (TEAA 62.5 mM)、検出波長: 254 nm) にて分析した結果を [表 4] に示す。

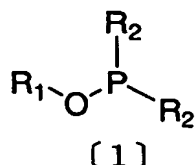
[表 4]

	実施例 5	比較例 9	比較例 10
反応選択性 (5 時間後)	284	177	117
収率 (% , 5 時間後)	99	97	92

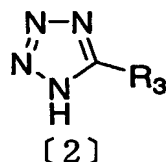
反応選択性 = (表題化合物の HPLC 面積 %) / (副成物 [5 d] の HPLC 面積 %) 但し、副成物 [5 d] の式中、R 1 は 2-シアノエチル基を、R 4 は 4, 4'-ジメトキシトリチル基を、R 5 は水素原子を、B は N 4-ベンゾイル-L-シトシンを表す。

請 求 の 範 囲

1. 一般式〔1〕

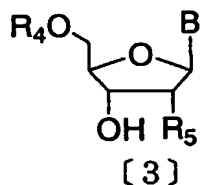


(式中、R₁は炭素数1から4のアルキル基、シアノ基で置換された炭素数1から4のアルキル基またはシリル基で置換された炭素数1から4のアルキル基を表し、R₂は炭素数2から5のアルキル基で置換されたアミノ基または炭素数4から7の脂環状アミノ基を表す。)で表される化合物を反応剤としてフォスフォロアミダイトを製造する方法であって、一般式〔2〕

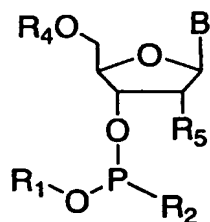


(式中、R₃は炭素数1から6の脂環状アルキル基、炭素数1から4のアルキル基で置換されたアリール基または置換されていないアリール基を表す。)で表される置換テトラゾールを反応活性化剤として用いることを特徴とする製造法。

2. 一般式〔3〕



(式中、R₄は水酸基の保護基を、R₅は水素原子、ハロゲン原子、炭素数1から4のアルキル基または置換された水酸基を、Bは核酸塩基または保護された核酸塩基を表す。)で表されるヌクレオシド誘導体を原料とし、一般式〔4〕



〔4〕

（式中、R 1、R 2、R 4、R 5 およびBは前述と同義である。）で表されるフォスフォロアミダイトを合成することを特徴とする請求項 1 に記載の製造法。

3. 一般式〔2〕中、R 3がフェニル基である請求項 1 又は 2 に記載の製造法。
4. 一般式〔1〕中、R 1がシアノエチル基であり、R 2がジイソプロピルアミノ基である請求項 1 から 3 の何れか一項に記載の製造法。
5. 一般式〔3〕および〔4〕中、R 4が4, 4'-ジメトキシトリチル基であり、R 5が水素原子であり、Bが1-チミン基、N 4-ベンゾイル-1-シトシン基、N 6-ベンゾイル-9-アデニン基またはN 2-イソブチリル-9-グアニン基である請求項 2 から 4 の何れか一項に記載の製造法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15529

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C07H19/073, 19/173

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C07H19/073, 19/173

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5278302 A (UNIVERSITY PATENTS, INC.), 11 January, 1994 (11.01.94), & WO 89/11486 A & EP 378615 A & JP 3-501128 A	1-5
A	JP 63-63694 A (Yuki Gosei Kogyo Co., Ltd.), 22 March, 1988 (22.03.88), (Family: none)	1-5
A	JP 62-70391 A (Nippon Zeon Co., Ltd.), 31 March, 1987 (31.03.87), (Family: none)	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 March, 2004 (02.03.04)

Date of mailing of the international search report
23 March, 2004 (23.03.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C07H19/073, 19/173

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C07H19/073, 19/173

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US 5278302 A (UNIVERSITY PATENTS, INC), 1994. 01. 11 & WO 89/11486 A & EP 378615 A & JP 3-501128 A	1-5
A	JP 63-63694 A (有機合成薬品工業株式会社), 1988. 03. 22 (ファミリーなし)	1-5
A	JP 62-70391 A (日本ゼオン株式会社), 1987. 03. 31 (ファミリーなし)	1-5

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02. 03. 2004

国際調査報告の発送日

23. 3. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

弘實 謙二

4 P

7433

電話番号 03-3581-1101 内線 3492